

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|  |           |   |
|--|-----------|---|
| <b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b><br><b>A61K 31/565, 31/57</b>  | <b>A1</b> | <b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 94/08588</b><br><b>(43) Date de publication internationale:</b> 28 avril 1994 (28.04.94)  |
| <b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR93/01029<br><b>(22) Date de dépôt international:</b> 19 octobre 1993 (19.10.93)<br><b>(30) Données relatives à la priorité:</b><br>92/12548 20 octobre 1992 (20.10.92) FR<br><b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS [FR/FR]; 27, rue Linné, F-75005 Paris (FR).<br><b>(72) Inventeur; et</b><br><b>(75) Inventeur/Déposant (US seulement) :</b> MORFIN, Robert [FR/FR]; 46, boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris (FR).<br><b>(74) Mandataires:</b> GUTMANN, Ernest etc. ; Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).   |           | <b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Publiée</b><br><i>Avec rapport de recherche internationale.</i> |
| <b>(54) Title:</b> PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING 3-BETA-HYDROXYLATED NATURAL STEROID DERIVATIVES, AND USE THEREOF<br><b>(54) Titre:</b> COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES CONTENANT DES DERIVES DE STEROIDES NATURELS 3BETA HYDROXYLES ET LEUR UTILISATION<br><b>(57) Abstract</b><br><p>A pharmaceutical composition containing 7-hydroxylated derivatives of natural steroid hormones having, if necessary, a 3<math>\beta</math> hydroxyl function, for use as an immunity trigger or stimulant (hereinafter termed "immunity effector"), particularly for cell immunity. Said pharmaceutical compositions may also be used as anti-glucocorticoid agents.</p> <b>(57) Abrégé</b><br><p>L'invention concerne notamment une composition pharmaceutique contenant des dérivés 7-hydroxylés d'hormones stéroïdes naturelles possédant, le cas échéant, une fonction 3<math>\beta</math> hydroxyle, et leur utilisation comme déclencheur ou stimulateur de l'immunité (ci-après dénommé "effecteur de l'immunité") et plus particulièrement de l'immunité cellulaire; ces compositions pharmaceutiques peuvent être également utilisées comme agents antiglucocorticoïdes.</p> |           |   |

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |   |    |                       |
|----|---------------------------|----|---|----|-----------------------|
| AT | Autriche                  | FR | France  | MR | Mauritanie            |
| AU | Australie                 | GA | Gabon   | MW | Malawi                |
| BB | Barbade                   | GB | Royaume-Uni                                   | NE | Niger                 |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée  | NL | Pays-Bas              |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce   | NO | Norvège               |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                       | NZ | Nouvelle-Zélande      |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                       | PL | Pologne               |
| BR | Brazil                    | IT | Italie  | PT | Portugal              |
| BY | Bélarus                   | JP | Japon   | RO | Roumanie              |
| CA | Canada                    | KP | République populaire démocratique<br>de Corée | RU | Fédération de Russie  |
| CF | République Centrafricaine | KR | République de Corée                           | SD | Soudan                |
| CG | Congo                     | KZ | Kazakhstan                                    | SE | Suède                 |
| CH | Suisse                    | LJ | Liechtenstein                                 | SI | Slovénie              |
| CI | Côte d'Ivoire             | LK | Sri Lanka                                     | SK | République slovaque   |
| CM | Cameroon                  | LU | Luxembourg                                    | SN | Sénégal               |
| CN | Chine                     | LV | Lettonie                                      | TD | Tchad                 |
| CS | Tchécoslovaquie           | MC | Monaco  | TC | Togo                  |
| CZ | République tchèque        | MG | Madagascar                                    | UA | Ukraine               |
| DE | Allemagne                 | ML | Mali  | US | Etats-Unis d'Amérique |
| DK | Danemark                  | MN | Mongolie                                      | UZ | Ouzbékistan           |
| ES | Espagne                   |    |   | VN | Viet Nam              |
| FI | Finlande                  |    |   |    |                       |

**COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES CONTENANT DES DERIVES  
DE STEROIDES NATURELS 3BETA  
HYDROXYLES ET LEUR UTILISATION**

La présente invention est relative à des compositions pharmaceutiques contenant à titre de principe actif des dérivés 7-hydroxylés d'hormones stéroïdes naturelles possédant, le cas échéant, une fonction  $3\beta$  hydroxyle, et leur utilisation comme déclencheur ou stimulateur de l'immunité (ci-après dénommé "effecteur de l'immunité") et plus particulièrement de l'immunité cellulaire ; ces compositions pharmaceutiques peuvent être également utilisées comme agents anti-glucocorticoïdes.

La famille des stéroïdes hormonaux  $3\beta$ -hydroxylés comprend: la pregnénolone connue comme  $3\beta$ -hydroxy-5-pregnène-20-one (désignée ci-après par PREG), la déhydroépiandrostérone connue comme  $3\beta$ -hydroxy-5-androstène-17-one (désignée ci-après par DHEA), l'androstènediol connu comme 5-androstène- $3\beta,17\beta$ -diol (désigné ci-après par 5-DIOL), l'iosandrostérone ou épiandrostérone connue comme  $3\beta$ -hydroxy- $5\alpha$ -androstane-17-one (désignée ci-après par ISOA) et l'androstaniol connu comme  $5\alpha$ -androstane- $3\beta,17\beta$ -diol (désigné ci-après par ADIOL).

La PREG est connue comme étant le précurseur de l'ensemble des hormones stéroïdes. La PREG est formée irréversiblement à partir du cholestérol dans des tissus et des organes comme la partie corticale des glandes surrénales, les gonades (E. Baulieu, Hormones, Publ. Hermann (1978)) et le cerveau (Z. Hu et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84, 8215-8219 (1987)). Formée dès le plus jeune âge, ses quantités circulantes sont élevées et relativement stables (E. DePeretti et E. Mappus, J. Clin. Endocr. Metab., 57, 550-556

(1983)). Elle peut être transformée en progestérone même dans le cerveau (Y. Akwa et al., J. Cell. Biol., 121, 135-143 (1993)) mais sa transformation irréversible en hormones minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes n'a lieu que dans les glandes corticosurrénales (E. Baulieu, Hormones, Publ. Hermann (1978)).

La DHEA est un 17-cétostéroïde qui est quantitativement une des hormones stéroïdes adrénocorticales majeures présentes dans le sang des humains et autres mammifères. M.E. Windholz, The Merck Index, Ninth Edition (1976); K. Diem and C. Lentner, Geigy Scientific Tables (1975); E. Barret-Connor et al., N.E.J.M. 315, 1519-1524 (1986). Bien que la DHEA semble servir d'intermédiaire dans la synthèse des stéroïdes des gonades, la première fonction physiologique de la DHEA n'est pas claire. Il est connu, cependant, que les concentrations plasmatiques de cette hormone, maximales dans la seconde décennie de la vie, déclinent ensuite pour finalement atteindre 5% du taux originel chez les personnes âgées.

Dans certains cas, la DHEA présente des propriétés d'effecteur de l'immunité : dans R.M. Loria, T.H. Inge, S.S. Cook, A.Z. Szakl et W. Regelson (1988), J. Med. Virol., 26, 301-314, elle permet d'augmenter la survie de souris infectées par les virus humains CVB4 Edwards ou HSV2, quand elle est injectée par voie sous-cutanée en quantités de l'ordre de 1 g/kg, et ce, 4 heures avant l'infection virale. Cet effet est aussi observé lorsque la DHEA est administrée par voie orale (0,4% dans le régime) pendant 16 semaines avant l'infection.

Plus généralement, les mêmes auteurs, dans le brevet US n° 5.077.284, démontrent un effet positif sur des patients atteints du SIDA traités par des doses 400 à 2500 mg/jour, et recommandent l'utilisation de la

DHEA, conjointement à un antiviral, à des doses de 25 mg/kg à 2 g/kg.

La production irréversible de DHEA à partir de la PREG est surtout connue dans le tissu corticosurrénalien et dans les gonades (E. Baulieu, Hormones, Publ. Hermann (1978)). La DHEA n'est d'ailleurs produite qu'à partir de l'adrénarche et sa quantité circulante augmente avec la puberté (E. DePeretti et E. Mappus, J. Clin. Endocr. Metab., 57, 550-556 (1983)). Dès l'âge adulte, des quantités importantes de DHEA circulent dans le sang des humains et des autres mammifères, mais ces quantités maximales dans la seconde décade de la vie humaine déclinent ensuite pour atteindre finalement moins de 10% du taux originel chez les personnes d'âge très avancé (N. Orentreich et al., J. Clin. Endocr. Metab., 59, 551-555 (1984)).

Le 5-DIOL dérive directement de la DHEA dont la fonction 17-cétone est réduite par une oxydoréductase. Ses quantités circulantes sont faibles comparées à celles de la DHEA car l'oxydoréduction agit aussi en sens inverse pour donner de la DHEA, et que des androgènes comme la testostérone peuvent en dériver même dans la peau (I. Faredin et I. Toth, Acta Med. Acad. Sci. Hung., 32, 139-152 (1975)).

Dans les gonades, la DHEA et le 5-DIOL sont successivement transformés de manière irréversible en hormones androgènes (testostérone) puis oestrogènes (oestradiol) par une série de réactions enzymatiques connues (E. Baulieu, Hormones, Publ. Hermann (1978)).

La testostérone est réduite irréversiblement dans les tissus cibles en son dérivé androgéniquement actif, la 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone. C'est de ce stéroïde que dérivent l'ADIOL et l'ISOA par des réactions enzymatiques réversibles (E. Baulieu, Hormones, Publ. Hermann (1978)). Les quantités circulantes de ces deux

stéroïdes sont faibles chez l'adulte et sont nulles avant la puberté et presque nulles après la ménopause et l'andropause (P. Mauvais-Jarvis et G. Charransol, Nvelle. Presse Médic., 23, 1565-1569 (1973); C. Hopkinson et al., J. Steroid Biochem., 8, 1253-1257 (1977); G. Habrioux et al., Steroids, 32, 61-71 (1978)).

L'utilisation de la PREG n'a jamais été envisagée pour des applications thérapeutiques car ce stéroïde est le précurseur de l'ensemble des hormones stéroïdes. Par contre, la DHEA a des effets démontrés dans différentes conditions physiopathologiques, incluant notamment le cancer, le diabète, le vieillissement, l'obésité. Ces différents effets sont décrits dans une série d'articles collégés dans un ouvrage récent sur les effets biochimiques, biologiques et cliniques de la DHEA (The biologic role of dehydroepiandrosterone, Editeurs: M. Kalimi et W. Regelson, Publication: Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1990). Le mode d'action exact de la DHEA y est étudié mais non encore expliqué de manière certaine. Toutes les publications indiquent que pour obtenir un effet, la DHEA doit être administrée soit oralement, soit en sous-cutané à des doses importantes allant de 25 mg/kg à 2g/kg, et ce, en administrations répétées.

Cependant, l'utilisation de la DHEA dans une composition thérapeutique ou prophylactique se heurte à trois problèmes :

- la faible solubilité de la DHEA dans des solutions aqueuses,
- la nécessité de l'injecter plusieurs heures avant l'antigène pour obtenir l'effet recherché,
- les quantités importantes nécessaires à l'obtention d'un effet risquent d'entraîner un coût prohibitif et des effets secondaires indésirables.

De la même manière, le 5-DIOL a récemment été utilisé pour obtenir une réponse antivirale augmentée chez la souris. Les doses reconnues comme efficaces sont de 20 mg/kg à 320 mg/kg après administration sous-cutanée, ou de 0,4% du poids des aliments (R. Loria et D. Padgett, Arch. Virol., 127, 103-115 (1992)). Les effets secondaires connus du 5-DIOL limitent néanmoins considérablement son utilisation thérapeutique chez l'homme.

Enfin, le ADIOL et l'ISOA ne sont pas employés ni envisagés en tant qu'agents thérapeutiques à cause de leur action androgène relativement fortée (P. Robel et al., Biochimie, 53, 81-96 (1971)).

Des stéroïdes 3 $\beta$ -hydroxylés comme la PREG, la DHEA, le 5-DIOL sont hydroxylés en position 7 dans de nombreux tissus comme cela a déjà été montré chez le rat (Y. Akwa et al., Biochem. J., 288, 959-964 (1992)) et la souris (R. Morfin et G. Courchay, J. Steroid Biochem. Molec. Biol., (sous presse)). Pour le ADIOL et l'ISOA, des hydroxylations en position 6 ou 7 ont été mises en évidence chez l'homme (R. Morfin et al., Biochimie, 59, 637-644 (1977)), chez le rat (J. Guiraud, R. Morfin et al., Steroids, 34, 241-248 (1979)) et chez le chien (R. Morfin et al. Eur. J. Biochem., 109, 119-127 (1980)). Cette découverte a été confirmée et étendue chez l'homme (F. Jacolot et al., J. Steroid Biochem., 14, 663-669 (1981); S. Tunn et al., J. Steroid Biochem., 28, 257-263 (1987)) et chez le rat (J. Isaacs et al., Steroids, 33, 639-657 (1979); M. Warner et al., Endocrinology, 124, 2669-2706 (1979)). Ces hydroxylations en 6 ou 7 sont spécifiques des stéroïdes 3 $\beta$ -hydroxylés et le processus enzymatique opère de manière irréversible.

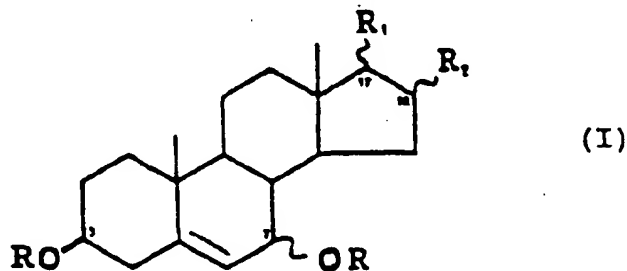
Il en ressort donc que les stéroïdes 6 ou 7-hydroxylés formés ne peuvent donner naissance aux hormones stéroïdes classiques telles que les

minéralocorticoïdes, glucocorticoïdes, progestatifs, androgènes et oestrogènes et ils sont apparus comme inactifs dans les domaines de ces dernières hormones (A. Sunde et al., J. Steroid Biochem., 16, 483-488 (1982); F. Celotti et al., J. Steroid Biochem., 18, 397-401 (1983)).

Divers articles récents démontrent aussi l'existence d'une association entre les systèmes endocriniens et immunitaires; il y est suggéré que la DHEA jouerait un rôle régulateur anti-glucocorticoïde (A. Meikle et al., J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 42, 293-304 (1992)), bien que des recherches avec ce stéroïde n'aient apporté que des réponses négatives (P. Mohan et M. Cleary, Steroids, 57, 244-247 (1992)).

La présente invention a pour but de pallier les différents problèmes soulevés plus haut sur l'utilisation thérapeutique de la DHEA ou de la PREG et découle de la découverte selon laquelle, non seulement les microsomes de cerveau de rat, mais la peau, l'intestin, le colon, le coecum, la rate, le thymus et le cerveau de la souris, étaient capables de convertir la DHEA et la prégénolone en des dérivés polaires, et plus hydrosolubles, que sont les dérivés 7 $\alpha$ -hydroxylés. Des dérivés 7 $\beta$ -hydroxylés ont également été détectés. De plus, la quantité de dérivés 7 $\alpha$ -hydroxylés augmente avec l'âge des animaux.

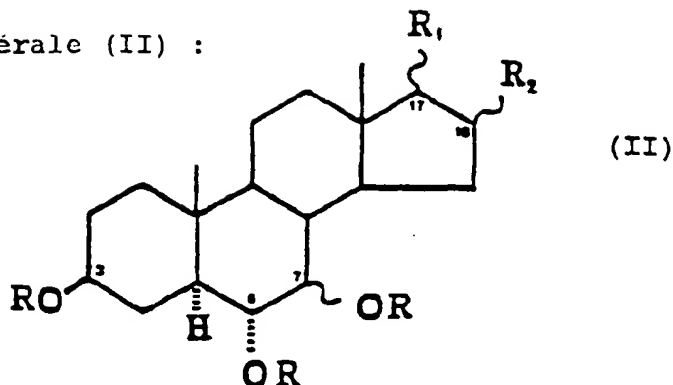
La présente invention est relative à des compositions pharmaceutiques comprenant à titre de principe actif des composés de formule générale :





7

ou la formule générale (II) :



dans lesquelles les substituants R, R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> ont les significations suivantes :

R = -H ou fonction ester de 1 à 100 atomes de carbone,

R<sub>1</sub> = -H<sub>2</sub> ou =O (cétone),

ou β-OH (hydroxyle),

ou β-CO-R<sub>3</sub>,

ou β-CHOH-R<sub>3</sub>,

avec R<sub>3</sub> étant un groupe alcoyle comprenant de 1 à 4 atomes de carbone, de préférence méthyle,

R<sub>2</sub> = -H ou un halogène,

les radicaux 6, 7 et en 16 peuvent être en position α ou β, en association avec un véhicule pharmaceutique.

Dans les composés préférés de l'invention, R est un hydrogène, R<sub>1</sub> est une fonction = O ou -CO-CH<sub>3</sub>.

Dans les composés de formule I ou II les substituants des hydrogènes en positions 6 et 7 peuvent être une cétone.

En outre, dans la formule générale II, les radicaux en 6 et 7 peuvent être mutuellement exclusifs ou être présents sur la même molécule.

L'invention concerne plus particulièrement les compositions pharmaceutiques dans lesquelles les composés du genre en question sont associés à un véhicule pharmaceutique approprié au mode d'administration choisi.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention contenant à titre de principe actif un composé de

formule I ou de formule II peuvent être utilisées comme effecteurs de l'immunité cellulaire, notamment dans :

- la prévention du développement du SIDA par traitement des sujets séropositifs pour HIV1, HIV2 et autres retrovirus responsables de ce syndrome,
- la prévention et le traitement des processus néoplasiques tels que les cancers de la peau, de l'intestin, des glandes mammaires, du système nerveux, des glandes surrénales, des gonades, et des leucémies,
- la prévention et le traitement des maladies auto-immunes telles le lupus érythémateux disséminé,
- le traitement des dysfonctionnements de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien,
- la prévention de l'immunosuppression due au stress, et du déclin de l'immunité naturelle avec l'âge ou toute autre immunosuppression.

L'invention concerne également l'utilisation des molécules de formule I ou II dans la fabrication d'une composition pharmaceutique utilisable comme anti-glucocorticoïde, et ce, dans toutes les utilisations thérapeutiques impliquant la recherche d'une action contraire à celle des glucocorticoïdes naturels ou de synthèse.

Les pathologies concernées sont toutes celles où l'utilisation d'agents glucocorticoïdes est médicalement déconseillée, ainsi que celles découlant des effets secondaires indésirables de ces mêmes glucocorticoïdes.

Parmi ces pathologies associées aux glucocorticoïdes, et aux effets secondaires indésirables dûs aux glucocorticoïdes, on peut citer, à titre d'exemples:

- le syndrome de Cushing,
- les tumeurs surrénaliennes,
- les désordres de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien,

- les effets diabétogènes et immunosuppresseurs des glucocorticoïdes,
- la faiblesse, l'atrophie musculaire, les retards de cicatrisation et l'amincissement de la peau dûs aux glucocorticoïdes,
- les ulcères digestifs, l'ostéoporose, la mobilisation des acides gras et l'accumulation des graisses résultant de la prise de glucocorticoïdes,
- la cataracte chez l'adulte et la diminution de la croissance des enfants traités par les glucocorticoïdes,
- les infections opportunistes, les dysménorrhées, les insomnies et les états dépressifs résultant de traitements ou d'actions glucocorticoïdes excessifs.

L'effet pharmacologique maximal de ces composés est obtenu par toute voie d'administration amenant la molécule active au niveau des cellules visées, ce qui comprend notamment l'administration per os, sous-cutanée, per-cutanée, intramusculaire ou topique.

Un dosage avantageux des composés de formule I ou II utilisés dans la fabrication de la composition thérapeutique est de 1 à 100 mg/kg chez les mammifères.

Aux fins d'administration d'un stéroïde, des solvants organiques sont habituellement utilisés dans la pharmacopée animale et humaine. Il s'agit notamment:

- du DMSO (diméthyl sulfoxyde) pour l'injection intramusculaire ou sous-cutanée;
- les solvants pour les stéroïdes injectables par voie sous-cutanée ou intramusculaire qui sont couramment des huiles végétales (ricin, olive, arachide,...) quelques fois hydrogénées ou neutralisées. Quelques stéroïdes sont aussi injectés sous forme de suspension dans la carboxyméthyl cellulose;
- les administrations transcutanées (pommades, gels) utilisant surtout des mélanges (galéniques et excipients) où l'on retrouve des alcools (éthylène,

propylène glycols), des alcools gras (stéarylique, octyl-2-dodécanol, en C<sub>20</sub> ...), de la vaseline, des huiles végétales (ricin, olive...).

De nouvelles formulations permettent aussi une absorption transcutanée ou transépithéliale retardée. Il s'agit d'inclusions dans le polyvinylpyrrolidone ou dans le polyéthylène glycol ou dans des matrices polymérisées avec de la silice fumée.

L'administration au niveau du colon peut utiliser la voie rectale avec des suppositoires (beurre de cacao) mais aussi la voie orale avec les cyclodextrines qui emprisonnent le principe actif hydrophobe et le libèrent une fois détruit dans le colon (J. Szetli, Pharmaceut. Technol. Int., 3, 16-24 (1991)).

L'invention concerne enfin les médicaments utilisables comme effecteurs de l'immunité ou destinés à la prévention ou au traitement de maladies ou de symptômes résultant de l'action de glucocorticoïdes caractérisés en ce qu'ils contiennent un composé de formule I ou de formule II en association avec un véhicule pharmaceutique approprié au mode d'administration choisi.

Les différents exemples qui suivent montrent sans caractère limitatif les effets thérapeutiques des dérivés 7 $\alpha$  ou 7 $\beta$ -hydroxylés, aussi bien comme effecteurs de l'immunité que comme agents anti-glucocorticoïdes.

#### **I- EFFET EFFECTEUR DE L'IMMUNITE**

L'effet effecteur de l'immunité a été éprouvé par injection sous-cutanée concomitante à celle d'un antigène et du dérivé 7 $\alpha$  ou 7 $\beta$ -hydroxylé à des souris C57BL/6, selon un protocole d'immunisation classique. (Methods in Enzymology (1980), vol. 70).

L'effet du composé comme effecteur de l'immunité cellulaire est mesuré par la quantité d'IgG circulantes

dirigées contre l'antigène, et ce, 21 jours après l'injection, après une injection de rappel à 14 jours.

Les exemples suivants, sans caractère limitatif, décrivent l'invention.

**- EXEMPLE I : Effet de la 7 $\alpha$ OH-DHEA et de la 7 $\beta$ OH-DHEA:**

. Préparation (synthèse) des 7 $\alpha$ - et 7 $\beta$ -hydroxy-déhydroépiandrostérone :

L'acétate de DHEA (1) (1 g, Sigma D-4500), est transformé en 3 $\beta$ -acétoxy, 7 $\alpha$ -bromoandrost-5-ène-17-one (2) par le procédé publié par J. ORR and J. BROUGHTON (J. Org. Chem. (1970) 35, 1126-1129) utilisant le N-bromosuccinimide sous irradiation lumineuse.

Le dérivé bromé obtenu est transformé en un mélange de 3 $\beta$ , 7 $\alpha$ ( $\beta$ )-diacétoxy-androst-5-ène-17-one (3) en traitant par le mélange acétate de K/acide acétique selon A. NUSSBAUM et al. (J. Am. Chem. Soc. (1960) 82, 2641).

Le mélange obtenu est saponifié dans CO<sub>3</sub>K<sub>2</sub> méthanolique à reflux pendant 3 heures. Après extraction des stéroïdes saponifiés, le 3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -dihydroxy-androst-5-ène-17-one (4) est séparé du 3 $\beta$ , 7 $\beta$ -dihydroxy-androst-5-ène-17-one (5) par chromatographie préparative sur gel de silice élué par l'acétate d'éthyle. L'épimère 7 $\beta$  est élué en premier complètement séparé du stéroïde 7 $\alpha$  qui est élué ensuite.

Le (4) est cristallisé dans acétate d'éthyle/n-hexane. Les cristaux (120 mg) ont un point de fusion de 182-183°C correspondant à ceux trouvés par R. DODSON et al. (J. Am. Chem. Soc. (1959) 81, 6295-6297) et par G. DEFAYE et al. (J. Steroid Biochem. (1978) 9, 331-336).

Le (5) est cristallisé de la même manière (280 mg). Les cristaux ont un point de fusion de 214-215°C correspondant à ceux trouvés par les mêmes auteurs que ci-dessus.

Le passage de (4) et (5) en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse sous la forme de dérivés di-triméthylsilyloxy donne pour chacun un ion moléculaire à 448 correspondant à la masse attendue et les mêmes temps de rétention et profils de fragmentation que celui des mêmes dérivés de (4) et (5) de référence (fournis par H.A. LARDY, Université du Wisconsin).

. Protocole d'immunisation :

Trente cinq lots de 5 souris C57BL/6 âgées de 6 semaines subissent une injection sous-cutanée de 200  $\mu$ g de lysozyme de blanc d'oeuf de poule le premier et le quatorzième jour d'un protocole d'immunisation. Des solutions de DHEA (Sigma D.4500) dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) sont injectées de la même manière à des temps variables avant la première injection de lysozyme. Des quantités comprises entre 0,25 et 2 g/kg sont utilisées. Dix autres lots de 5 souris subissent une injection sous-cutanée de 6,25 à 50 mg/kg de 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA ou de 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA en solution dans le DMSO au même moment que la première du lysozyme. Deux lots ne reçoivent que le DMSO avec le lysozyme (contrôles). Les blancs correspondant à un lot de 5 souris ne subissant aucune injection.

Trois semaines après les premières injections, les animaux alors âgés de 9 semaines sont décapités. Le sang de chaque animal est recueilli, et la présence d'immunoglobulines G (IgG) anti-lysozyme est mesurée dans des dilutions en série des sérums par un dosage immunoenzymatique utilisant des IgG de chèvre anti-IgG de souris (Fc) marquées à la peroxydase.

Les résultats sont indiqués dans les lignes 1, 3, 6 et 7 du tableau 1, où l'effet particulièrement marqué des faibles doses de la 7 $\alpha$ OH-DHEA apparaît. La 7 $\beta$ OH-DHEA a un effet équivalent à celui de la DHEA injectée

1 heure avant l'antigène, mais à des doses 20 fois plus faibles.

- **EXEMPLE II : Effet du 7 $\alpha$  OH et 7 $\beta$  OH prégnénolone :**

. Préparation (synthèse) des 7 $\alpha$ - et 7 $\beta$ -hydroxy-prégnénolone :

L'acétate de prégnénolone (1) (Sigma, P-9254), est transformé en 3 $\beta$ -acétoxy-7 $\alpha$ -bromoprégn-5-ène-20-one (2) par le procédé publié par J. ORR and J. BROUGHTON (J. Org. Chem. (1970), 35, 1126-1129) utilisant le N-bromosuccinimide sous irradiation lumineuse.

Le dérivé bromé obtenu est transformé en un mélange de 3 $\beta$ , 7 $\alpha$ ( $\beta$ )-diacétoxy-prégn-5-ène-20-one (3) en traitant par le mélange acétate de K/acide acétique selon A. NUSSBAUM et al. (J. Am. Chem. Soc. (1960) 82, 2641)..

Le mélange obtenu est saponifié dans CO<sub>3</sub>K<sub>2</sub> méthanolique à reflux pendant 3 heures. Après extraction des stéroïdes saponifiés, le 3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -dihydroxy-prégn-5-ène-20-one (4) est séparé du 3 $\beta$ , 7 $\beta$ -dihydroxy-prégn-5-ène-20-one (5) par chromatographie préparative sur gel de silice élué par l'acétate d'éthyle. L'épimère 7 $\beta$  est élué en premier complètement séparé du stéroïde 7 $\alpha$  qui est élué ensuite.

Le (4) est cristallisé dans l'acétate d'éthyle/n-hexane. Les cristaux sont contrôlés par résonance magnétique nucléaire (200 MHz), 0.55 (3H, s, Me-18), 0.99 (3H, s, Me-19), 2.13 (3H, s, Me-21), 3.62 (1H, m, H-3), 3.86 (1H, s, H-7), 5.62 (1H, d, H-6). Le passage du dérivé di-triméthylsilyloxy de (4) en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse donne l'ion moléculaire attendu à 476 et le profil de fragmentation correspondant.

Le (5) est cristallisé dans l'acétate d'éthyle/n-hexane. Les cristaux sont contrôlés par résonance magnétique nucléaire (200 MHz), 0.63 (3H, s, Me-18), 1.05 (3H, s, Me-19), 2.12 (3H, s, Me-21), 3.53 (1H, m,

H-3) , 3.83 (1H, d, H-7), 5.30 (1H, s, H-6). Le passage du dérivé di-triméthylsilyloxy de (5) en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse donne l'ion moléculaire attendu à 476 et le profil de fragmentation correspondant.

. Protocole d'immunisation :

Celui-ci est réalisé de la même façon que dans l'exemple I.

Les résultats sont indiqués lignes 2 et 5 du tableau 1.

- EXEMPLE III : Effet des androst-5-ène-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ ( $\beta$ ), 17 $\beta$ -triol (7 $\alpha$ OH ADIOL et 7 $\beta$ OH ADIOL) :

. Préparation (synthèse) des androst-5-ène-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ ( $\beta$ ), 17 $\beta$ -triol (7 $\alpha$ OH ADIOL et 7 $\beta$ OH ADIOL) :

L'acétate de déhydroépiandrosterone (DHEA) (1)(Sigma, D-4500), est oxydé en position 7 par le complexe CrO<sub>3</sub>-diméthylpyrazole selon SALMOND et al. (J. Org. Chem. (1978) 43, 2057) et conduit au 3 $\beta$ -acétoxy-androst-5-ène-7, 17-dione (2). Ce produit est identique (point de fusion, Rf chromatographique, absorption UV, spectre de masse) à celui fourni en référence par J. JACQUES (Collège de France).

(2) est réduit par NaBH<sub>4</sub> dans le méthanol et conduit au mélange des épimères 3 $\beta$ -acétoxy- 7 $\alpha$ ( $\beta$ ), 17 $\beta$ -dihydroxy-androst-5-ène (3). Après saponification du mélange (3) dans le KOH/méthanol, les androst-5-ène-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 17 $\beta$ -triol (4) et androst-5-ène-3 $\beta$ , 7 $\beta$ , 17 $\beta$ -triol (5) sont successivement obtenus et complètement séparés par chromatographie sur gel de silice élué par l'acétate d'éthyle.

(4) et (5) sont cristallisés dans l'acétone/n-hexane. Les cristaux de (4) ont un point de fusion de 272-273°C correspondant à celui rapporté par G. DEFAYE et al. (J. Steroid Biochem. (1978) 9, 331-336) et son dérivé tri-triméthyl-silyloxy présente, après chromatographie en phase gazeuse couplée à la



spectrométrie de masse l'ion moléculaire attendu à 522 et le profil de fragmentation correspondant.

Les cristaux de (5) ont un point de fusion de 244-245°C correspondant à celui rapporté par G. DEFAYE et al. J. Steroid Biochem. (1978) 9, 331-336), et son dérivé tri-triméthylsilyloxy présente, après chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse l'ion moléculaire attendu à 522 et le profil de fragmentation correspondant.

. Immunisation :

Un lot de 5 souris subit l'injection sous-cutanée de 125 mg/kg de 5-androstène-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol (ADIOL) une heure avant la première injection de lysozyme, et deux lots de 5 souris sont traités par 25 mg/kg de 7 $\alpha$ -hydroxy-ADIOL ou de 7 $\beta$ -hydroxy-ADIOL au moment de la première injection de lysozyme.

. Résultats :

Les résultats sont indiqués lignes 4, 8 et 9 du tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Mesures immunoenzymatiques des IgG anti-lysozyme présentes dans le sérum de souris C57BL/6 immunisées contre le lysozyme après traitement par la prégénolone (PREG) ou la DHEA ou l'androst-5-ène-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol ou leurs dérivés 7-hydroxylés ou par aucun stéroïde.

La DHEA ou la PREG ou l'ADIOL est injecté sous la peau 1 heure avant la première injection de lysozyme. Les dérivés 7-hydroxylés sont administrés au moment de l'injection du lysozyme. La mesure immunoenzymatique des IgG anti-lysozyme dans des dilutions sériées des sérums de chaque animal utilise des IgG de chèvre anti-IgG de souris marquées à la peroxydase sur des plaques 96-puits traitées au lysozyme. La moyenne des densités optiques mesurées dans chaque lot de 5 souris est calculée ainsi que la déviation standard (SD).

TABLEAU 1

\* Calculé à partir des mesures sur des dilutions supérieures du sérum.

| Stéroïde injecté<br>(dose)                   |       | Densités optiques $\pm$ SD dans les<br>dilutions sériques |                  |                 |
|--|-------|---|------------------|-----------------|
| 1/180  | 1/540 |   |                  |                 |
| 1. Contrôles (nulle)                         |       | 0,15 $\pm$ 0,01   | 0,13 $\pm$ 0,01  | 0,10 $\pm$ 0,01 |
| 2. PREG (0,5 g/kg)                           |       | *4,67 $\pm$ 1,21  | 1,83 $\pm$ 0,48  | 0,56 $\pm$ 0,15 |
| 3. DHEA (1,0 g/kg)                           |       | 0,40 $\pm$ 0,06   | 0,26 $\pm$ 0,04  | 0,14 $\pm$ 0,02 |
| 4. ADIOL (125 mg/kg)                         |       | 0,26 $\pm$ 0,09   | 0,37 $\pm$ 0,06  | 0,22 $\pm$ 0,03 |
| 5. 7 $\alpha$ -hydroxy-PREG<br>(6,25 mg/kg)  |       | *4,46 $\pm$ 0,30  | *2,20 $\pm$ 0,14 | 0,77 $\pm$ 0,05 |
| 6. 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA<br>(6,25 mg/kg)  |       | 1,21 $\pm$ 0,37   | 0,74 $\pm$ 0,21  | 0,43 $\pm$ 0,12 |
| 7. 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA<br>(50,0 mg/kg)   |       | 0,46 $\pm$ 0,06   | 0,31 $\pm$ 0,04  | 0,13 $\pm$ 0,01 |
| 8. 7 $\alpha$ -hydroxy-ADIOL<br>(25,0 mg/kg) |       | 0,15 $\pm$ 0,02   | 0,14 $\pm$ 0,01  | 0,11 $\pm$ 0,01 |
| 9. 7 $\beta$ -hydroxy-ADIOL<br>(25,0 mg/kg)  |       | 0,18 $\pm$ 0,06   | 0,18 $\pm$ 0,02  | 0,12 $\pm$ 0,01 |

La PREG, la DHEA et l'ADIOL augmentent les concentrations sériques d'IgG anti-lysozyme lorsque ces stéroïdes sont administrés au moins une heure avant l'injection du lysozyme. Les meilleurs réponses sont obtenues avec 0,5 g/kg de PREG et 1 g/kg de DHEA (tableau 1). Lorsque ces stéroïdes sont injectés au même moment que le lysozyme, les quantités d'IgG restent identiques à celles trouvées chez les contrôles.

Par contre, les dérivés 7 $\alpha$ -hydroxylés de la PREG et de la DHEA déclenchent une production accrue d'IgG lorsqu'ils sont administrés au même moment que le lysozyme. La quantité la plus faible injectée (6,25 mg/kg) est la plus active (tableau 1). L'injection dans ces conditions de 50 mg/kg de 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA donne une réponse identique à celle de 1g/kg de DHEA administrée

1 heure avant celle du lysozyme (tableau 1). Les dérivés 7-hydroxylés de l'ADIOL ne déterminent, à la dose testée, qu'une très faible augmentation des IgG anti-lysozyme sériques (tableau 1).

Ces résultats relient l'hydroxylation tissulaire des précurseurs naturels des hormones stéroïdes au déclenchement de la réponse immunitaire. Le temps de latence pour l'action de la PREG ou de la DHEA sur l'augmentation des IgG anti-lysozyme implique la transformation de ces stéroïdes en métabolites actifs. La démonstration de leur hydroxylation en  $7\alpha$  dans les tissus cutanés, et celle de l'effet immédiat de ces dérivés  $7\alpha$ -hydroxylés sur la production accrue d'IgG anti-lysozyme contribuent à le prouver. L'étude des hydroxylations de stéroïdes  $3\beta$ -hydroxylés dans divers tissus chez plusieurs espèces (R. Morfin, S. Di Stéfano, J.F. Charles and H.H. Floch (1977) *Biochimie*, 59, 637-644; J.T. Isaacs, I.R. Mc Dermott and D.S. Coffey (1979), *Steroids*, 33, 675-692; M. Warmer, P. Tollet, M. Strömstedt, K. Carlström and J.A. Gustafsson (1989), *J. Endocrinol.*, 122, 341-349; Y. Akwa, R. Morfin, P. Robel and E.E. Baulieu, (1992), *Biochem. J.*, 288, 959-964 ; R. Morfin, résultats non publiés sur la souris) a prouvé que l'hydroxylation en 7 est majoritaire en  $7\alpha$  mais avec de faibles quantités en  $7\beta$ . Il apparaît aussi que la  $7\alpha$ -hydroxy-DHEA est bien plus active que son épimère en  $7\beta$ . Il n'en reste pas moins que les épimères en  $7\beta$  et les compositions les contenant doivent également être considérés comme faisant partie de l'invention.

Ces exemples sont donnés à titre d'illustration mais ne sont pas limitatifs

- ni de la dose utilisée,
- ni de la présence d'une double liaison 5-6 sur le stéroïde,
- ni de l'effet observé sur la synthèse des IgG.

La DHEA 7 $\alpha$ -hydroxylée constitue un métabolite naturel de la DHEA, ce qui pourrait expliquer les difficultés antérieurement observées avec la DHEA. En effet, les quantités de DHEA nécessaires à la mise en évidence des effets physiologiques observés par divers auteurs (The biologic role of Dehydroepiandrosterone, Editeurs M. Kalimi, W. Regelson, Publication Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1990), et le fait qu'un effet stimulateur de l'immunité nécessitait une injection préalable à celle de l'antigène, s'expliquent-ils peut-être à posteriori par le fait que les activités observées pour la DHEA devaient passer par une nécessaire métabolisation préalable de ce stéroïde.

## II- EFFET ANTIGLUCOCORTICOÏDE :

L'effet anti-glucocorticoïde de ces molécules a été prouvé par les études de leur compétition avec la Dexaméthazone radio-marquée pour sa rétention nucléaire dans les cellules de tissus hépatique, cérébral, splénique et thymique chez la souris C57BL/6, selon le protocole publié par P. Mohan et M. Cleary sur des hépatocytes de rat (Steroids, 57, 244-247 (1992)). Ce protocole expérimental est lui-même une adaptation de la méthode de D. Colvar et al; (Clin. Chem., 34, 363-369 (1988)).

Les exemples suivants, sans caractère limitatif décrivent l'invention.

La figure 1 représente l'effet anti-glucocorticoïde de différents dérivés testés, mesurés par compétition avec la dexaméthasone radioactive quant à leur liaison sur les noyaux d'hépatocytes de rat.

Les hépatocytes isolés sont incubés pendant 1 heure à température ambiante avec des concentrations croissantes (2-80 nM) de <sup>3</sup>H-Dexaméthazone (DEX\*). Les mêmes incubations sont répétées en présence d'un excès

de 100 fois (200-8000 nM) de Dexaméthazone non radioactive (DEX\*/DEX) ou de 7 $\alpha$ -hydroxy DHEA (DEX\*/7 $\alpha$ DHEA) ou de 7 $\alpha$ -hydroxy-5DIOL (DEX\*/7 $\alpha$ 5DIOL) ou de 6 $\alpha$ -hydroxy-ISOA (DEX\*/6 $\alpha$ ISOA) ou de 7 $\alpha$ -hydroxy-ISOA (DEX\*/7 $\alpha$ ISOA). Les noyaux des hépatocytes sont ensuite isolés et purifiés et la radioactivité correspondant à la DEX\* retenue est mesurée et exprimée en cpm/10 $\mu$ g d'ADN. L'aire sous la courbe DEX\* correspond à un déplacement nul de la radioactivité (zéro). L'aire sous la courbe DEX\*/DEX qui correspond au déplacement de la radioactivité par la même molécule est pris arbitrairement comme 100. Les aires sous les courbes obtenues avec les autres stéroïdes permettent de calculer par interpolation entre les aires zéro et 100 les coefficients de déplacement de la liaison nucléaire de la DEX\*.

Le fait que les stéroïdes testés qui se sont révélés les plus actifs soient des dérivés naturels des hormones stéroïdes androgènes prend pleinement sa signification au travers des nombreuses interactions observées au cours de traitements par des associations de glucocorticoïdes et de stéroïdes androgènes anabolisants (O. Linet, Progr. Drug Res., 14, 139-195 (1970)). Les effets "anti-glucocorticoïdes" observés à la suite de ces traitements sont très variables et peuvent être maintenant expliqués par la nécessité d'une métabolisation préalable des stéroïdes androgènes administrés afin que des dérivés 7-hydroxylés actifs soient produits.

Cette constatation amène donc à considérer des molécules stéroïdes de synthèse reconnues comme possédant un effet semblable à celui de leur parent naturel, telle la 16-Bromo-ISOA (A. Schwartz et al., Adv. Cancer Res., Publ. Academic Press, 51, 391-424 (1988); G. Gordon et al., Adv. Enzyme Regul., Publ. Pergamon Press, 26, 355-382 (1987)). La transformation

possible d'un tel stéroïde en un dérivé 6- ou 7-oxygéné particulièrement actif nous amène donc à considérer que ces dérivés et les compositions les contenant font partie de l'invention.

Le mécanisme exact de l'interaction des stéroïdes 6- et 7-oxygénés avec le complexe Glucocorticoïde-récepteur-ADN n'est pas résolu ; néanmoins, l'effet anti-glucocorticoïde observé dans chacun des exemples donnés peut être considéré comme une illustration non limitative des dérivés utilisables dans la mesure où il répond à l'une des formules I ou II ci-dessus. Ces exemples ne sont pas non plus limitatifs de la dose, ni du mode d'administration utilisés, ni des effets thérapeutiques résultant de leur utilisation.

**- EXEMPLE IV: Effet anti-glucocorticoïde de la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA et de la 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA:**

**Préparation (synthèse) des 7 $\alpha$ - et 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA:**

Celle-ci est effectuée comme dans l'exemple I.

**Test d'activité anti-glucocorticoïde:**

Des souris C57BL/6 âgées de 7 à 12 semaines sont traitées par la Métyrapone (25mg/kg) 24 heures et 12 heures avant le sacrifice des animaux, de manière à diminuer leur taux de glucocorticoïdes naturels et à augmenter les concentrations cellulaires en récepteurs spécifiques des glucocorticoïdes (R. Rupprecht et al., J. Neuroendocr., 2, 803-806 (1990)). Les souris sont anesthésiées à l'éther et saignées, puis perfusées par la voie intracardiaque avec du sérum physiologique contenant de la collagénase B (0.03g/100ml) pendant 10 minutes. Le foie, le cerveau, la rate et le thymus sont prélevés et les cellules de chaque organe sont récupérées par la méthode décrite (P. Mohan et M. Cleary, Steroids, 57, 244-247 (1992)). Les quantités de cellules obtenues sont estimées sur la base de la mesure de l'ADN contenu dans les préparations. Les

cellules sont incubées pendant 1 heure à température ambiante en présence de quantités croissantes (2nM à 80nM) de Dexaméthazone tritiée additionnée ou non d'une quantité 100 fois supérieure de Dexaméthazone non radioactive ou d'un des composés à tester.

Les noyaux sont récupérés et leur contenu radioactif mesuré comme décrit par les auteurs cités plus haut.

Les résultats correspondants sont portés sur une courbe (Figure 1) où la radioactivité mesurée par 10 $\mu$ g d'ADN cellulaire est exprimée en fonction de la molarité de Dexaméthazone tritiée incubée. Le déplacement attendu de la Dexaméthazone tritiée par la Dexaméthazone non radioactive est observé. L'aire sous la courbe de la Dexaméthazone tritiée seule est mesurée et prise comme zéro. L'aire sous la courbe de la Dexaméthazone tritiée additionnée d'un excès de 100 fois en Dexaméthazone non radioactive est mesurée et prise comme 100. Les aires sous courbe, pour chacun des stéroïdes non radioactifs testés par addition individuelle d'une quantité 100 fois supérieure à celle de la Dexaméthazone tritiée, sont mesurées et leur coefficient de déplacement de la Dexaméthazone tritiée liée dans les noyaux calculé par interpolation sur la base du zéro et du 100.

Les résultats obtenus pour chacun des quatre organes avec la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA et la 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA sont présentés dans le tableau 2 aux lignes 1 et 2. Le déplacement de la Dexaméthazone tritiée qu'ils occasionnent dans les noyaux prouve leur action anti-glucocorticoïde, la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA étant plus efficace que l'épimère 7 $\beta$ .

**- EXEMPLE V: Effet anti-glucocorticoïde d la 7 $\alpha$ -hydroxy-PREG et de la 7 $\beta$ -hydroxy-PREG:**

Préparation (synthèse) des 7 $\alpha$ - et 7 $\beta$ -hydroxy-PREG:

Cette préparation est identique à celle décrite dans l'exemple II.

Test d'activité anti-glucocorticoïde:

Celui-ci est réalisé de la même façon que dans l'exemple IV.

Les résultats sont indiqués aux lignes 3 et 4 du tableau 2. Le déplacement de la Dexaméthazone tritiée qu'ils occasionnent dans les noyaux prouve leur effet anti-glucocorticoïde.

**- EXEMPLE VI: Effet des 5-androstène-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ( $\beta$ ),17 $\beta$ -triols (7 $\alpha$ -hydroxy-5DIOL et 7 $\beta$ -hydroxy-5DIOL):**

Préparation (synthèse) des 7 $\alpha$ -hydroxy-5DIOL et 7 $\beta$ -hydroxy-5DIOL:

La préparation est identique à celle décrite dans l'exemple III.

Test d'activité anti-glucocorticoïde:

Celui-ci est réalisé de la même manière que dans l'exemple IV.

Seul le 7 $\alpha$ -hydroxy-5DIOL est testé sur les noyaux d'hépatocytes. Les résultats sont indiqués à la ligne 5 du tableau 2. Le déplacement de la Dexaméthazone tritiée liée dans les noyaux d'hépatocytes par le 7 $\alpha$ -hydroxy-5DIOL prouve son effet anti-glucocorticoïde.

**- EXEMPLE VII: Effet des dérivés 6- et 7-oxygénés de stéroïdes 3 $\beta$ -hydroxylés et 5 $\alpha$ -réduits:**

Préparation (synthèse) des 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstane-7,17-dione (7-oxo-ISOA), 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstane-17-one (6 $\alpha$ -hydroxy-ISOA), 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstane-17-one (7 $\alpha$ -hydroxy-ISOA), 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstane-17-one (7 $\beta$ -hydroxy-ISOA), 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol (7 $\alpha$ -hydroxy-ADIOL) et 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,



7 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol (7 $\beta$ -hydroxy-ADIOL):

La synthèse, l'identification et les propriétés chromatographiques de ces stéroïdes ont été effectuées par nos soins et publiées en détail (A. Kerebel, R. Morfin, F. Berthou et al., J. Chromatogr., 140, 229-244 (1977)).

Deux autres stéroïdes sont commerciaux: la 3 $\beta$ -hydroxy-5-pregnène-7,20-dione (7-oxo-PREG) (Steraloids Inc., Q5400), et la 3 $\beta$ -hydroxy-5-androstène-7,17-dione (7-oxo-DHEA) (Steraloids Inc., A8320).

Tests d'activité anti-glucocorticoïde:

Ceux-ci sont réalisés avec ces molécules de la même façon que dans l'exemple I. Les résultats obtenus sont indiqués aux lignes 6,7,8,9,10,11 et 12 du tableau 2 où les dérivés de l'ISOA et de l'ADIOL se révèlent tous très actifs.

Légende du Tableau 2 :

Les stéroïdes suivants, désignés de 1 à 13 sont:

1. 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA (7 $\alpha$ -OH-DHEA),
2. 7 $\beta$ -hydroxy-DHEA (7 $\beta$ -OH-DHEA),
3. 7 $\alpha$ -hydroxy-PREG (7 $\beta$ -OH-PREG),
4. 7 $\beta$ -hydroxy-PREG (7 $\beta$ -OH-PREG),
5. 7 $\alpha$ -hydroxy-5DIOL (7 $\alpha$ -OH-5DIOL),
6. 7 $\alpha$ -hydroxy-ISOA (7 $\alpha$ -OH-ISOA),
7. 7 $\beta$ -hydroxy-ISOA (7 $\beta$ -OH-ISOA),
8. 7 $\alpha$ -hydroxy-ADIOL (7 $\alpha$ -OH-ADIOL),
9. 6 $\alpha$ -hydroxy-ISOA (6 $\alpha$ -OH-ADIOL),
10. 7-oxo-PREG,
11. 7-oxo-DHEA,
12. 7-oxo-ISOA,
13. Dexaméthazone (DEX).

Le déplacement de la liaison nucléaire de la Dexaméthazone tritiée par une concentration 100 fois supérieure de chacun de ces stéroïdes est mesuré comme indiqué dans la Figure 1. L'absence de stéroïde compétiteur est prise comme zéro, et la présence de Dexaméthazone non radioactive prise comme 100. les coefficients de déplacement entraînés par chacun des autres stéroïdes sont calculés sur cette base, chaque résultat étant la moyenne de triplicata.

TABLEAU 2

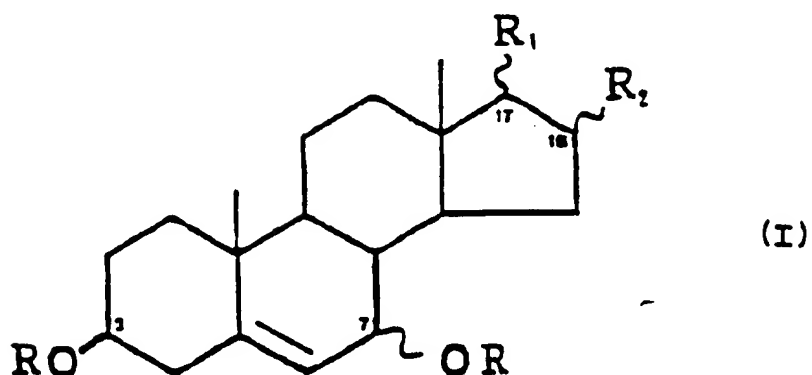
|    | Stéroïde testé       | Foie | Cerveau | Thymus | Rate |
|----|----------------------|------|---------|--------|------|
| 1. | 7 $\alpha$ -OH-DHEA  | 95   | 49      | 85     | 91   |
| 2. | 7 $\beta$ -OH-DHEA   | 80   | 65      | -      | -    |
| 3. | 7 $\alpha$ -OH-PREG  | 34   | 38      | 94     | 81   |
| 4. | 7 $\beta$ -OH-PREG   | 82   | -       | -      | -    |
| 5. | 7 $\alpha$ -OH-5DIOL | 88   | -       | -      | -    |
| 6. | 7 $\alpha$ -OH-ISOA  | 102  | -       | -      | -    |
| 7. | 7 $\beta$ -OH-ISOA   | 68   | -       | -      | -    |
| 8. | 7 $\alpha$ -OH-ADIOL | 83   | 96      | 96     | 125  |
| 9. | 6 $\alpha$ -OH-ISOA  | 63   | -       | -      | -    |
| 10 | 7-oxo-PREG           | 35   | -       | -      | -    |
| 11 | 7-oxo-DHEA           | 28   | -       | -      | -    |
| 12 | 7-oxo-ISOA           | 84   | -       | -      | -    |
| 13 | DEX                  | 100  | 100     | 100    | 100  |

Les résultats présentés ci-dessus montrent que les dérivés 7-hydroxylés de la DHEA, de l'ISOA et du 5-DIOL déplacent activement la Dexaméthazone tritiée de sa liaison nucléaire. Les déplacements avec les autres stéroïdes sont significatifs mais moins marqués. Le fait que ces résultats soient exprimés par rapport au déplacement obtenu par des quantités équivalentes de Dexaméthazone non radioactive, et notre observation précédente (demande de brevet français n° 92.12548) démontrant un effet immunoactivateur de ces mêmes stéroïdes chez la souris qui implique le blocage de l'effet immunosuppresseur connu des glucocorticoïdes, conduisent à proposer l'utilisation de stéroïdes testés dans une composition pharmaceutique pour un traitement anti-glucocorticoïde.

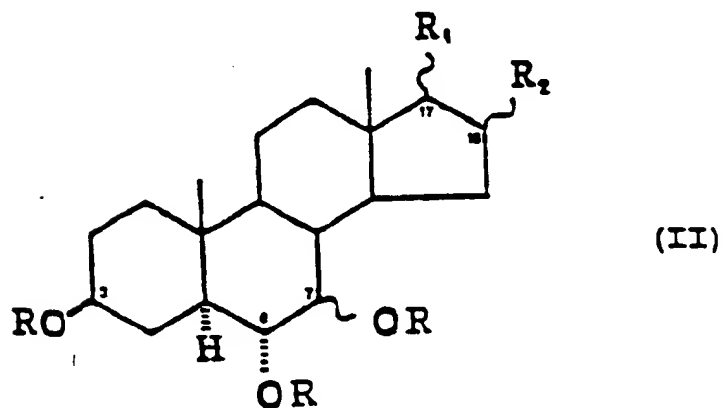
La Dexaméthazone est un stéroïde de synthèse qui est peu métabolisé (H. Siebe et al., Renal Physiol. Biochem., 16, 79-88 (1993)) et qui possède une affinité pour le récepteur cytosolique des glucocorticoïdes supérieure à celle des glucocorticoïdes naturels tels que la corticostérone ou le cortisol. Le fait que la liaison du complexe Dexaméthazone-récepteur cytosolique sur les sites de reconnaissance nucléaires soit diminuée par les stéroïdes testés confirme la potentialité d'un effet anti-glucocorticoïde. Par ailleurs, nos travaux (non rapportés ici) indiquent qu'il n'existe pas de récepteurs cytosoliques ou nucléaires spécifiques de la 7 $\alpha$ -hydroxy-DHEA, mais son action conduisant à l'activation des processus immunitaires peut être considérée comme essentiellement anti-glucocorticoïde.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique contenant un composé de formule générale I :



ou de formule générale II :



dans lesquelles :

R = -H ou fonction ester de 1 à 100 atomes de carbone,

R1 = -H<sub>2</sub> ou =O (cétone),

ou β-OH (hydroxyle),

ou β-CO-R<sub>3</sub>,

ou β-CHOH-R<sub>3</sub>,

avec  $R_3$  tant un groupe alcoyle comprenant de 1 à 10 atomes de carbone, de préférence méthyle, substitué ou non,

$R_2 = -H$  ou un halogène, ou un radical carbonitrile, les radicaux en 6, 7 et en 16 peuvent être en position  $\alpha$  ou  $\beta$ , et dans lesquels le cas échéant les substituants des hydrogènes en position 6 ou 7 peut être une cétone,

les composés de formule I ou de formule II étant associés dans ladite composition avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

2. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que le composé et le véhicule pharmaceutique sont associés sous une forme galénique permettant une administration soit per os, soit per cutanée, soit sous-cutanée, soit topique.

3. Composition selon les revendications 1 et 2, caractérisée par le fait que son dosage est tel qu'il permet une administration de 1 à 100 milligrammes du composé par Kg chez les mammifères

4. Composition selon les revendications 1 à 3 caractérisée en ce qu'elle contient aussi un principe actif de vaccin.

5. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans la prévention du développement du SIDA par traitement des sujets séropositifs pour HIV1, HIV2 et autres retrovirus responsables de ce syndrome.

6. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans la prévention et le traitement des processus néoplasiques tels que les cancers de la peau, de l'intestin, des glandes

mammaires, du système nerveux, des glandes surrénales, des gonades, et des leucémies.

7. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans la prévention et le traitement des maladies auto-immunes telles le lupus érythémateux disséminé.

8. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans le traitement des dysfonctionnements de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien.

9. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans la prévention de l'immunosuppression due au stress, et du déclin de l'immunité naturelle avec l'âge ou toute autre immunosuppression.

10. Composition vaccinale comprenant le composé selon les revendications 1 à 4, en association avec un antigène vaccinant, en tant qu'adjuvant pour augmenter la réponse immunogène de cet antigène vaccinant chez l'homme ou l'animal.

11. Composition pharmaceutique contenant les composés selon les revendications 1 à 4 pour le traitement et la prophylaxie des maladies virales bactériennes, fongiques ou parasitaires chez l'animal ou chez l'homme.

12. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou de formule II, lequel est utilisable seul ou en association avec un autre composé comme antagoniste des glucocorticoïdes.

13. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou de formule II et destiné au traitement des productions pathologiques de glucocorticoïdes naturels tels le syndrome de Cushing ou les tumeurs surrenaliennes.

14. Composition pharmaceutique selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou de formule II, lequel composé est utilisable dans le traitement des dysfonctionnements de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien.

15. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou de formule II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans la prévention et le traitement des effets diabétogènes et lipidogènes dus aux glucocorticoïdes.

16. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou de formule II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans la prévention et le traitement de l'atrophie musculaire et de la faiblesse causés par les glucocorticoïdes.

17. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou de formule II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans la prévention et le traitement des ulcères digestifs causés par l'utilisation ou un excès de glucocorticoïdes.

18. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou de formule II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans la prévention et le traitement de l'ostéoporose et de la fragilité osseuse résultant de l'action des glucocorticoïdes naturels ou de synthèse.

19. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou de formule II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans la prévention et le traitement de la cataracte résultant de l'action des glucocorticoïdes naturels ou de synthèse.

20. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou de formule II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans la prévention de la diminution de la croissance des enfants traités par les glucocorticoïdes.

21. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou de formule II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans la prévention et le traitement des insomnies et des états dépressifs résultant de l'action des glucocorticoïdes naturels ou de synthèse.

22. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou de formule II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans le traitement des dysmenorrhées résultant de l'action des glucocorticoïdes.

23. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un composé de formule I ou de formule II, lequel composé est utilisable seul ou en association avec un autre composé dans la prévention et le traitement des infections opportunistes favorisées par l'action des glucocorticoïdes.

24. Médicament destiné à la prévention ou au traitement de maladies ou de symptômes résultant de l'action de glucocorticoïdes, caractérisé en ce qu'il contient un composé de formule I ou de formule II en



association avec un véhicule pharmaceutique approprié  
au mode d'administration choisi.

1/1

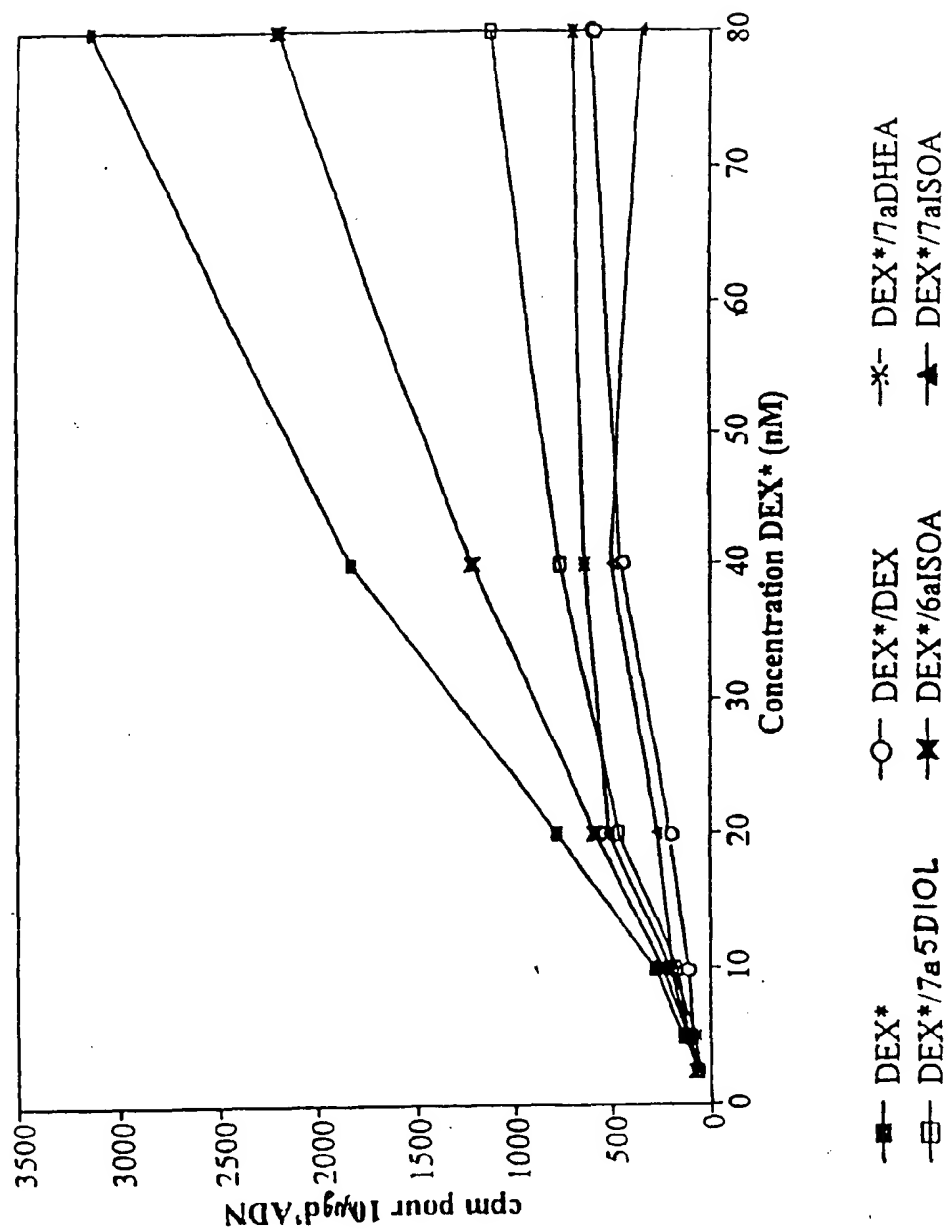


Figure 1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/FR 93/01029

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 A61K31/565 A61K31/57

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | WO,A,92 03925 (HUMANETICS CORPORATION) 19 March 1992<br>see claims<br>see page 2, line 20 - line 37<br>see page 10, line 1 - line 5<br>---   | 1-3                   |
| X          | US,A,4 898 694 (A.G.SCHWARTZ) 6 February 1990<br>see column 5, line 1 - line 32<br>see column 6, line 22 - line 28<br>see column 10, line 32 - line 65<br>*colonne 31:carbon-7 hydroxylation*<br>*colonne 42:halogenation at carbon-16*<br>see column 73, line 3 - line 33<br>see column 73, line 41 - line 59<br>see column 74, line 9 - line 17<br>---<br>-/-- | 1-3,6,7               |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 January 1994

Date of mailing of the international search report

03.02.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

SCARPONI, U

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. .onal Application No

PCT/FR 93/01029

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| Y          | US,A,4 628 052 (R.F.PEAT) 9 December 1986<br><br>see claims 2,4-10<br>see column 2, line 35 - line 68<br>see column 3, line 5 - line 21<br>---  | 1-5,7,9,<br>12        |
| Y          | DE,A,38 12 595 (COLTHURST LTD.) 27 October 1988<br><br>see claims 1,6,8,10-12<br>see page 5, line 59 - line 68<br>see page 6, line 1 - line 8<br>---  | 1-5,7,9,<br>12        |
| Y          | WO,A,91 04030 (UNIVERSITY OF UTAH) 4 April 1991<br><br>see claims 1-5,7-10,15,16<br>see page 7, line 20 - line 31<br>see page 8, line 25 - line 36<br>see page 13, line 1 - line 5<br>see page 15, line 1 - line 15<br>see page 17, line 6 - line 14<br>see page 18, line 20 - line 25<br>--- | 1-5,7,9,<br>12        |
| Y          | US,A,5 077 284 (R.M.LORIA) 31 December 1991<br><br>cited in the application<br>see claims<br>-----  | 1-5,7,9,<br>12        |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 93/01029

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)  | Publication<br>date  |
|---|---------------------|---|--|
| WO-A-9203925                              | 19-03-92            | AU-A- 8541891<br>CA-A- 2090759<br>EP-A- 0547151   | 30-03-92<br>01-03-92<br>23-06-93   |
| US-A-4898694                              | 06-02-90            | NONE  |  |
| US-A-4628052                              | 09-12-86            | NONE  |  |
| DE-A-3812595                              | 27-10-88            | AU-B- 608824<br>AU-A- 1467888<br>BE-A- 1004315<br>CH-A- 675358<br>FR-A- 2615394<br>GB-A, B 2204237<br>JP-A- 1025722<br>LU-A- 87202<br>NL-A- 8800926<br>OA-A- 8729<br>SE-A- 8801406<br>US-A- 4956355 | 18-04-91<br>20-10-88<br>03-11-92<br>28-09-90<br>25-11-88<br>09-11-88<br>27-01-89<br>17-11-88<br>16-11-88<br>31-03-89<br>17-10-88<br>11-09-90 |
| WO-A-9104030                              | 04-04-91            | AU-A- 6501990<br>EP-A- 0494224<br>JP-T- 5502856   | 18-04-91<br>15-07-92<br>20-05-93   |
| US-A-5077284                              | 31-12-91            | NONE  |  |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No  
PCT/FR 93/01029

|  |   |  |
|--|---|--|
| <b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b><br>CIB 5    A61K31/565    A61K31/57  |   |  |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB  |   |  |
| <b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b><br>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)<br>CIB 5    A61K   |   |  |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche  |   |  |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)  |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>  |   |  |
| Catégorie *  | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées  |
| X  | WO,A,92 03925 (HUMANETICS CORPORATION) 19 Mars 1992<br>voir revendications<br>voir page 2, ligne 20 - ligne 37<br>voir page 10, ligne 1 - ligne 5<br>---  | 1-3  |
| X  | US,A,4 898 694 (A.G.SCHWARTZ) 6 Février 1990<br>voir colonne 5, ligne 1 - ligne 32<br>voir colonne 6, ligne 22 - ligne 28<br>voir colonne 10, ligne 32 - ligne 65<br>*colonne 31:carbon-7 hydroxylation*<br>*colonne 42:halogenation at carbon-16*<br>voir colonne 73, ligne 3 - ligne 33<br>voir colonne 73, ligne 41 - ligne 59<br>voir colonne 74, ligne 9 - ligne 17<br>---<br>-/-- | 1-3,6,7  |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>  |   |  |
| <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div> |   |  |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée<br><br><div style="text-align: center; font-weight: bold;">18 Janvier 1994</div>   |   | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale<br><br><div style="text-align: center; font-weight: bold;">03.02.94</div> |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale<br>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+ 31-70) 340-3016  |   | Fonctionnaire autorisé<br><br><div style="text-align: center; font-weight: bold;">SCARPONI, U</div>  |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Devis. de l'Internationale No

PCT/FR 93/01029

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| Y         | US,A,4 628 052 (R.F.PEAT) 9 Décembre 1986<br>voir revendications 2,4-10<br>voir colonne 2, ligne 35 - ligne 68<br>voir colonne 3, ligne 5 - ligne 21<br>---  | 1-5,7,9,<br>12                |
| Y         | DE,A,38 12 595 (COLTHURST LTD.) 27 Octobre 1988<br>voir revendications 1,6,8,10-12<br>voir page 5, ligne 59 - ligne 68<br>voir page 6, ligne 1 - ligne 8<br>---  | 1-5,7,9,<br>12                |
| Y         | WO,A,91 04030 (UNIVERSITY OF UTAH) 4 Avril 1991<br>voir revendications 1-5,7-10,15,16<br>voir page 7, ligne 20 - ligne 31<br>voir page 8, ligne 25 - ligne 36<br>voir page 13, ligne 1 - ligne 5<br>voir page 15, ligne 1 - ligne 15<br>voir page 17, ligne 6 - ligne 14<br>voir page 18, ligne 20 - ligne 25<br>--- | 1-5,7,9,<br>12                |
| Y         | US,A,5 077 284 (R.M.LORIA) 31 Décembre 1991<br>cité dans la demande<br>voir revendications<br>-----  | 1-5,7,9,<br>12                |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De Je Internationale No

PCT/FR 93/01029

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s)   | Date de<br>publication   |
|---|------------------------|---|--|
| WO-A-9203925                                    | 19-03-92               | AU-A- 8541891<br>CA-A- 2090759<br>EP-A- 0547151   | 30-03-92<br>01-03-92<br>23-06-93   |
| US-A-4898694                                    | 06-02-90               | AUCUN   |  |
| US-A-4628052                                    | 09-12-86               | AUCUN   |  |
| DE-A-3812595                                    | 27-10-88               | AU-B- 608824<br>AU-A- 1467888<br>BE-A- 1004315<br>CH-A- 675358<br>FR-A- 2615394<br>GB-A, B 2204237<br>JP-A- 1025722<br>LU-A- 87202<br>NL-A- 8800926<br>OA-A- 8729<br>SE-A- 8801406<br>US-A- 4956355 | 18-04-91<br>20-10-88<br>03-11-92<br>28-09-90<br>25-11-88<br>09-11-88<br>27-01-89<br>17-11-88<br>16-11-88<br>31-03-89<br>17-10-88<br>11-09-90 |
| WO-A-9104030                                    | 04-04-91               | AU-A- 6501990<br>EP-A- 0494224<br>JP-T- 5502856   | 18-04-91<br>15-07-92<br>20-05-93   |
| US-A-5077284                                    | 31-12-91               | AUCUN   |  |